

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-501698

第1部門第1区分

(43)公表日 平成7年(1995)2月23日

(51) Int.Cl. [*] C 12 P 21/08 C 07 K 7/06 14/705 C 12 N 15/09	識別記号 9161-4B 8318-4H 8318-4H 9050-4B	序内整理番号 F I
		C 12 N 15/00 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平5-510218
 (86) (22)出願日 平成4年(1992)11月25日
 (85)翻訳文提出日 平成6年(1994)5月30日
 (86)国際出願番号 PCT/US92/10140
 (87)国際公開番号 WO93/11162
 (87)国際公開日 平成5年(1993)6月10日
 (31)優先権主張番号 801, 798
 (32)優先日 1991年11月29日
 (33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 プロテイン デザイン ラブス, インコーポレイティド
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 94043,
 マウンテン ビュー, ガルシア アベニュー
 2375
 (72)発明者 ツォー, ジェイ, ユン
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 94025,
 メンロパーク, #16, オーク グローブ
 アベニュー 445
 (74)代理人 弁理士 石田 敏 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】二価特異性ヘテロ二量体

(57)【要約】

ロイシンジッパーにより形成される二価特異性抗体の製造及び利用方法を提供する。ヘテロ二量体を優先的に形成せしめることのできるロイシンジッパーはそれぞれ別々の結合特異性を含んで成るエピトープ結合性成分に連結されている。二価特異性抗体はロイシンジッパーの対合的会合により形成され、2つの異なるエピトープ結合性成分を連結せしめるヘテロ二量体を形成する。ヘテロ二量化は、二価特異性抗体を形成する2つのロイシンジッパー領域の相互作用により起こる。かかる二価特異性抗体はジスルフィド結合の如きの分子間化学結合によって更に安定となりうる。モノマーサブユニット間のかかる分子間結合の形成の後、ロイシンジッパーは除去又は残してよい。これらの方法により生成される二価特異性抗体は実質的に純粋であり、そして高収率で大量スケールで生産されうる。他方、二価特異性ヘテロ二量体はエピトープ結合性成分ではない巨大分子物質にエピトープ結合性成分を連結することにより形成されうる。

特表平7-501698 (2)

請求の範囲

1. 二価特異性抗体であつて：

第一エピトープ結合性成分に連結した第一ロイシンジッパーを含んで成る第一タンパク質；及び

第二エピトープ結合性成分に連結した第二ロイシンジッパーを含んで成る第二タンパク質；を含んで成り、ここで前記第二ロイシンジッパーが前記第一ロイシンジッパーに対する対合的親和性を有している、二価特異性抗体。

2. 一方のロイシンジッパーが Posロイシンジッパーである、請求項1に記載の二価特異性抗体。

3. 一方のロイシンジッパーが Junロイシンジッパーである、請求項1に記載の二価特異性抗体。

4. 二価特異性抗体であつて：

第一エピトープ結合性成分に連結した Posロイシンジッパーを含んで成る第一タンパク質；及び

第二エピトープ結合性成分に連結した Junロイシンジッパーを含んで成る第二タンパク質；

を含んで成る二価特異性抗体。

5. 前記の第一及び第二ロイシンジッパーが共に構造式（ロイシン-X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆）である、ここで各X₁、X₂、X₃、X₄、X₅及びX₆は常用の20のアミノ酸より成る群から選ばれ、そしてnが少なくとも3の整数である、請求項1に記載の二価特異性抗体。

6. 前記第一ロイシンジッパーが図1(b)に示すアミノ酸配列を有し、そして前記第二ロイシンジッパーが図1(a)に示すアミノ酸配列を有す、請求項1に記載の二価特異性抗体。

共に構造式（ロイシン-X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆）に相当するアミノ酸配列を含んで成り、ここで各X₁、X₂、X₃、X₄、X₅及びX₆は常用の20のアミノ酸より成る群から選ばれ、そしてnは少なくとも3の整数である、請求項11に記載の方法。

15. 前記の第一タンパク質と第二タンパク質との前記の接触をインピトロで行う、請求項11に記載の方法。

16. 前記の第一タンパク質と第二タンパク質との前記の接触をこの第二タンパク質を発現する單一の細胞の中でインヒボで行う、請求項11に記載の方法。

17. 二価特異性抗体を製造するための方法であつて：

第一エピトープに結合可能な第一エピトープ結合性成分に連結した第一ロイシンジッパーを含んで成る第一タンパク質を作り；

第二エピトープに結合可能な第二エピトープ結合性成分に連結した第二ロイシンジッパーを含んで成る第二タンパク質を作り（ここで前記第二ロイシンジッパーは前記第一ロイシンジッパーに対する対合的親和性を有する）；

前記第一タンパク質を前記第二タンパク質と接触させてヘテロ二量体を形成せしめ；

この第一エピトープ結合性成分と第二エピトープ結合性成分との間で直接結合を形成せしめ（ここでこの直接結合が形成された後、ロイシンジッパー配列はエピトープ結合性成分から分離でき、且つ前記直接結合は保持される）；

前記第一ロイシンジッパーと前記第一エピトープ結合性成分との間の結合を切断し；次いで

前記第二ロイシンジッパーと前記第二エピトープ結合性成分との間の結合を切断して、第二エピトープ結合性成分に連結した第一エピトープ結合性成分のヘテロ二量体を含んで成る二価特異性抗体を

7. 前記第一エピトープ結合性成分がヒトIL-2レセプタータンパク質に、約10⁹ M⁻¹以上の親和力で結合する、請求項1に記載の二価特異性抗体。

8. 前記第一エピトープ結合性成分がヒトCD3タンパク質に、約10⁹ M⁻¹以上の親和力で結合する、請求項1に記載の二価特異性抗体。

9. 前記第一エピトープ結合性成分が Fab' である、請求項1に記載の二価特異性抗体。

10. 前記エピトープ結合性成分の少なくとも一方がヒト化イムノグロブリンである、請求項1に記載の二価特異性抗体。

11. 二価特異性抗体の製造方法であつて：

第一エピトープに結合可能な第一エピトープ結合性成分に連結した第一ロイシンジッパーを含んで成る第一タンパク質を作り；

第二エピトープに結合可能な第二エピトープ結合性成分に連結した第二ロイシンジッパーを含んで成る第二タンパク質を作り（ここで前記第二ロイシンジッパーは前記第一ロイシンジッパーに対する対合的親和性を有する）；そして

前記第一タンパク質を前記第二タンパク質と、P（Fab'-ジッパー）_nヘテロ二量体の形成が可能な条件において接触させて前記二価特異性抗体を形成せしめること；

を含んで成る方法。

12. 一方のロイシンジッパーが Pos又は Junロイシンジッパーである、請求項11に記載の方法。

13. 一方のロイシンジッパーが Posロイシンジッパーであり、そして他方のロイシンジッパーが Junロイシンジッパーである、請求項11に記載の方法。

14. 前記第一ロイシンジッパー及び前記第二ロイシンジッパーが

形成せしめること；

を含んで成る方法。

18. エピトープ結合性成分の少なくとも一方が Fab' である、請求項17に記載の方法。

19. 前記第一エピトープ結合性成分と前記第二エピトープ結合性成分との間の前記の結合がジスルフィド結合である、請求項17に記載の方法。

20. 結合した第一及び第二エピトープ結合性成分を前記の切断した第一及び第二ロイシンジッパーから単離する段階を更に含んで成る、請求項17に記載の方法。

21. エピトープ結合性成分からのロイシンジッパーの切断を、ヒドロキシルアミンにより切斷できるアスパラギン-グリシンペプチド結合を含んで成る連結において行う、請求項17に記載の方法。

22. エピトープ結合性成分及びロイシンジッパーを含んで成るポリペプチドをエンコードするポリヌクレオチドを含んで成る組成物。

23. 前記ロイシンジッパーが Jun 又は Posロイシンジッパーである、請求項22に記載の組成物。

24. ロイシンジッパー、並びに V_{CK}及び抗体重鎖のヒンジドメインを含んで成るエピトープ結合性成分をエンコードするポリヌクレオチド。

25. 前記のエンコードされるエピトープ結合性成分が Fab' である、請求項23に記載のポリヌクレオチド。

特表平7-501698 (3)

明細書

二価特異性ヘテロ二量体

発明の技術分野

本発明は二価特異性抗体、他のエピトープ結合性成分と特異的なヘテロ二量体を形成することのできるエピトープ結合性成分、かかる二価特異性抗体及びエピトープ結合性成分を作るための方法、かかる二価特異性抗体及びエピトープ結合性成分を利用する方法、並びにかかる二価特異性抗体及びエピトープ結合性成分を含む薬理組成物に関する。

発明の背景

二価特異性抗体は二重エピトープ結合特異性を有する抗体であり、第一の特異性は第一エピトープに結合する能力であり、そして第二の特異性は第二エピトープに結合する能力である。

かかる二価特異性抗体は、ある細胞において、免疫療法にとって潜在的に価値のある分子である。例えば、二価特異性抗体は標的細胞に細胞傷害性エフェクター細胞を架橋せしめることがで（SegalとSeldner, (1989) *Chem. Immunol.* 47: 179）、標的細胞を殺傷をもたらす。

莫大な数の二価特異性抗体がインビトロで有効性を示しているが（Gillilandら、(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7719; LanzavecchiaとScheidegger(1987) *Eur. J. Immunol.* 17: 105; StearsとBevan(1986) *Immunol. Today* 7: 241; Bergら(1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4732）、治療剤として臨床試験されているものはあまりない。治療剤として二価特異性抗体の開発

の遅さの一つの理由は、十分なる純度及び量においてそれらを製造するうえでの困難性にある。

二価特異性抗体は化学架橋により、ハイブリドーハイブリドーマにより (MilsteinとCesario, (1984) *Immunol. Today* 5: 299) もしくはトランスクレクトマより、又は二種の Fab' のヒンジでのジスルフィルド交換により製造されてきた。その第一の方法は不均質、且つ一定でない生成物をもたらしてしまう。第二の方法は数多くのハイブリドー抗体開発物に原因して二価特異性抗体の多大なる精製を必要とし、その副産物の存在は細胞の架橋活性を妨害しうる。ジスルフィド交換法は本質的に P(ab')_n にのみ適用され、従って酵素消化による切断に対するモノクローナル抗体の感受性によって制約される (Parham(1983) *J. Immunol.* 131: 2895)。更に、Fab' は互いに對して弱い親和力を有するため、Fab' 間ジスルフィド結合の形成のために非常に高いタンパク質濃度を必要とする。このジスルフィド交換法は、Fab' の一方を他方の Fab' で酸化する前に改質せしめる Ellman 試薬の利用により、ホモ二量化の発生率を引き下げることで改善されている (Brennanら、(1985) *Science* 229: 81)。しかしながら、この改善によってさえも、ヘテロ二量体の P(ab')_n は 50% 以上の收率で生成されることはない (Glennie ら、(1987) *J. Immunol.* 139: 2367)。

従って、効率的に二価特異性抗体及びその他の類似化合物を高純度で生産するための改良方法が明らかに要望され続けている。

発明の概要

本発明は二価特異性抗体の生産のための新規の方法であって：1) 例えば遺伝子発現によって P(ab')_n 及び／又はその他のエピトープ結合性成分を直接生成すること、並びに 2) 二価特異性抗体の

効率的な生産を確実なものとするためにヘテロ二量体形成用配列を利用すること、を含む。利用するその配列は転写因子 Fos 及び Jun のロイシンジッパー (Landachulz ら (1988) *Science* 240: 1759、及び参考のため、Maniatis と Abel (1989) *Nature* 341: 24 を参照のこと；共に引用することで本明細書に組入れれる）領域に由来する。ロイシンジッパーは約 20~40 残基の長さの特定のアミノ酸配列であり、ロイシンが一般に 7 個の残基毎に見い出せる。かかるジッパー配列は両親媒性 α-ヘリックスを形成しており、ここでロイシン残基は二量体の形成のために疎水側に並んでいる。Fos 及び Jun タンパク質のロイシンジッパーに相当するペプチドはヘテロ二量体を優先的に形成する (O'Shea ら、(1989) *Science* 245: 646)。

本発明においては、二種のジッパー配列を、二種の Fab' に融合したときに二価特異性 P(ab')_n 形成を助長せしめるように採用している。二価特異性抗体は、二種類のジッパー配列の対合的会合が、一方のジッパーを含む第一 Fab' 又はその他のエピトープ結合性成分を、他方のジッパーを含む第二 Fab' 又はその他のエピトープ結合性成分に連結せしめる本発明の方法により作られる。これらの細胞において、ヘテロ二量体分子は双方のエピトープ結合性成分の結合特性を含んで成るであろう。

本発明は、エピトープ結合性成分に連結されているロイシンジッパーを含む第一タンパク質と、エピトープ結合性成分に連結されているロイシンジッパーを含む第二タンパク質とより形成された二価特異性抗体を提供し、ここでこの第一及び第二タンパク質のロイシンジッパーは、この第一及び第二タンパク質を含んで成るヘテロ二量体が形成するほどの対合的親和力を有する。本発明のある細胞において、ロイシンジッパーの一方は Fos ロイシンジッパー又は Jun ロイシンジッパーである。本発明の一態様において、一方のロイシン

ジッパーは Fos ロイシンジッパーであり、そして他方は Jun ロイシンジッパーである。本発明はまた、構造配列 (ロイシン-X₁-X₂-X₃-X₄-X₅) の第一及び第二ロイシンジッパーを有する二価特異性抗体を提供し、ここで X₁, X₂, X₃, X₄, X₅ 及び X₆ のそれぞれは常用の 20 アミノ酸のうちのいづれかであり、そして n は少なくとも 3 の整数である。

本発明はヒト IL-2 レセプターに結合する二価特異性抗体及びヒト CD3 タンパク質に結合する二価特異性抗体を提供する。本発明はまた、Fab' である少なくとも一のエピトープ結合性成分を有する二価特異性抗体を提供する。本発明の一定の態様は、ヒト化イムノグロブリンである少なくとも一のエピトープ結合性成分を有する。

本発明はまた、二価特異性抗体を製造するための方法を提供し、ここで第一及び第二タンパク質を作り（それぞれはエピトープ結合性成分とロイシンジッパーとを含む）、次いでその第一と第二タンパク質を、二価特異性抗体が形成されるようヘテロ二量体の形成を可能にする条件のもとで接触させる。第一及び第二タンパク質の接觸はインビトロで、又は両方のタンパク質を発現する同一の細胞の中でインビオで行ってよい。ある細胞において、本法は式 (ロイシン-X₁-X₂-X₃-X₄-X₅)_n (ここで X₁, X₂, X₃, X₄, X₅ 及び X₆ のそれぞれは常用の 20 アミノ酸のうちのいづれかであり、そして n は少なくとも 3 の整数である) に相当する Fos もしくは Jun ロイシンジッパー、又はその他の類似のロイシンジッパーを有するタンパク質を利用する。本発明のある方法において、P(ab')-ジッパー_n ヘテロ二量体二価特異性抗体は最終生成物として生産されうるか、又はそれはロイシンジッパーを除去するために切断（例えばヒドロキシアルミニによるアスパラギンーグリシンペプチド結合の切断）して二つの Fab' が化学結合（例えばジス

特表平7-501698 (4)

ルフィド結合により) している $P(ab')$; 二価特異性抗体をもたらしてよい。 Pab' 以外のエビトープ結合性成分が、ロイシンジッパーは除去されているが化学結合によって連結している二価特異性抗体を形成するために本発明の方法において用いることができる。

本発明はまた、エビトープ結合性成分及びロイシンジッパーを含む、特に V, CR₁ 及び抗体の重鎖のヒンジドメインを有するエビトープ結合性成分、そしてより詳しくは Pab' を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドを提供する。

Pab' 以外のエビトープ結合性成分を用いている、及び／又は二価特異性抗体の一方の成分がエビトープ結合性成分ではない巨大分子物質であるその他の二価特異性抗体もこれらの方により作ることができる。

本発明はまた、二価特異性抗体の処理組成物、かかる二価特異性抗体の治療的利用、診断及び研究用途における二価特異性抗体を利用する方法及び組成物を包括する。

図面の簡単な説明

図 1. Jun(A) 及び Fos(B) ロイシンジッパーの配列。矢印はインソトロン H : C_{N2} 及びエクソン C_{N2} 間のスプライシング部位を示す。

図 2. 抗-Tac-Jun(A) 及び抗-CD3-Fos の発現のためのプラスミドの構造の図式。コード配列を棒として示す。制限部位についての記号は: B, BamH I ; P, RspI ; R, Hind III ; S, Sal I ; X, Xba I ; そして Xb, Xba I 。

図 3. ラット抗マウスカッパーセファロースにより精製した抗-Tac-Jun 及び抗-CD3-Fos の SDS PAGE 分析。タンパク質を 12.5% のポリアクリルアミドゲルで分析し、そしてクマジーブルーで染めた。レーン 1, 2, 3 は精製抗 CD3-Fos 、そしてレーン 4,

ルアミンで還元した後の抗 CD3-Fos 、そしてレーン 5, レッドックス缓冲液に対して透析した後の抗-Tac-Jun × 抗-CD3-Fos 。全てのタンパク質サンプルを、サンプル SDS バッファー中で煮沸する前に、遊離スルフヒドリルをプロックするために 20mM のヨードアセトアミドで処理した。M.W.マークーは図 3 の中で用いているものと同じである。それらは使用前に還元用サンプル SDS バッファーの中で煮沸した。略語は: $F(ab')$, $P(ab'-ジッパー)$, Pab' , Pab' -ジッパー；そして LC, 軽鎖。

図 7. インピトロで形成した二価特異性 $P(ab'-ジッパー)$ の部分。インピトロで形成せしめた抗-Tac-Jun × 抗-CD3-Fos を、BAKERBOND ABx カラムに載せる前に 10mM の MES バッファー pH5.2 に対して透析した。カラムに結合したタンパク質を (NH₄)₂SO₄ の勾配により溶出させた。(A) 280nm での吸収プロファイル。(B) フローサイトメトリーによりアッセイした種々の部分についての抗-CD3(O) 及び抗-Tac(■) 活性。

図 8. (A) 非還元又は(B) 還元条件下で泳動させた図 7 におけるピーク部分の SDS PAGE 分析。レーン 1, ABx カラム素通り部分；レーン 2, 部分 I ; レーン 3, 部分 II ; レーン 4, 部分 III ; そしてレーン 5, 部分 IV 。サンプリングのために部分 II 及び部分 IV からより多くの容量(5 倍)を取った。M.W.マークーは図 3 に用いたものと同じである。略語は: $P(ab')$, $P(ab'-ジッパー)$, LC, 軽鎖；そして Pd , Pd -ジッパー。

図 9. インピトロで形成した二価特異性抗-Tac-Jun × 抗-CD3-Fos により仲介された標的化細胞障害性。25:1 (O) 及び 10:1 (O) の比でエフェクター及び³¹Cr-ラベル標的細胞を、特異的な溶解のために種々の濃度の部分 III (図 7 A) とインキュベートした。

5, 6 は非還元条件のもとで泳動させた抗-Tac-Jun である。レーン 7, 8, 9 は抗-CD3-Fos 、そしてレーン 10, 11, 12 は非還元条件下で泳動させた抗-Tac-Jun 。M.W.マークーは: ホスホリーゼ b, 94kd; ウシ血清アルブミン、67kd; オバルブミン、43kd; カルボニックアンヒドライゼ、30kd; ダイズトリプシンインヒビター、20kd; そしてリゾチーム、14kd である。略語は: $P(ab')$, $P(ab'-ジッパー)$, LC, 軽鎖；そして Pd , Pd -ジッパー。

図 4. PPLC による BAKERBOND ABx カラムでの抗-Tac-Jun 及び抗-CD3-Fos 発現性超トランスクレクト体の使用培地の分画。

(A) (NH₄)₂SO₄ の勾配により溶離させた濃度の 280nm でのタンパク質の吸収プロファイル。早めに溶離したタンパク質(部分 I)はトランスクレリン及びインスリンの如きの主たる培地補助物である。

(B) ELISA により決定したマウス IgG 隣性部分。414nm での吸収は、ペルオキシダーゼーコンジュゲート化ヤギ抗マウス IgG である二次抗体により発色した色を示す。(C) フローサイトメトリーによりアッセイした種々の部分についての抗 CD3 (O) 及び抗-Tac(■) 活性。

図 5. 部分 II 由来の二価特異性抗体により仲介された標的化細胞障害性。100:1 (O), 25:1 (O) 及び 10:1 (■) の比でのエフェクター及び³¹Cr-ラベル標的細胞を、特異的な溶解のために部分 II の様々な希釈物とインキュベートした(図 4 A)。点は三重測定の平均値を示す。タンパク質濃度はフローサイトメトリーにより評価した。

図 6. 非還元条件下での SDS PAGE により分析した、インピトロでの二価特異性 $P(ab'-ジッパー)$ の形成。レーン 1, 還元前の抗-Tac-Jun ; レーン 3 : 4mM の 2-メルカプテチルアミンにより還元した後の抗-Tac-Jun ; レーン 4, 2mM の 2-メルカブトエチ

発明の詳細な説明

本発明に従い、二価特異性抗体、かかる二価特異性抗体の製造方法、二価特異性抗体の実験組成物、かかる二価特異性抗体の治療的利用、並びに診断及び研究用途において二価特異性抗体を利用するための方法及び組成物を提供する。

定義

「 $P(ab')$ 」ヘテロ二量体は本明細書では、第一エビトープに対する結合特異性を有する第一 Pab' 及び第二エビトープに対する結合特異性を有する第二 Pab' を含んで成る二量体と定義し、ここでこの第一と第二エビトープは同一ではない。

「 Pab' -ジッパー」は、ロイシンジッパーに連結している Pab' と定義する。

「 $P(ab'-ジッパー)$ 」は本明細書では、第一エビトープに対する結合特異性を有し、且つロイシンジッパーに連結している第一 Pab' 、及び第二エビトープに対する結合特異性を有し、且つロイシンジッパーに連結している第二 Pab' を含んで成る二量体と定義し、ここで前記第一及び第二エビトープは同一でない。

本発明の「エビトープ結合性成分」は、イムノグロブリン超科の遺伝子により実質的にエンコードされる又は既知のポリペプチドより成るタンパク質を意味する(例えば、The Immunoglobulin Gene Superfamily, A.P. Williams と A.H. Barclay, Immunoglobulin Genes, T. Honjo, P.W. Alt と T.E. Rabbits 編(1988)Academic Press : San Diego, CA, 頁 361 - 387 を参照のこと；引用することで本明細書に組入れる)。例えば、限定するわけではないが、エビトープ結合性成分は重鎖の一部もしくは全体と、軽鎖の一部もしくは全体とを含んで成るか、又は重鎖の一部もしくは全体を含んで成りうる。しかしながら、エビトープ結合性成分は、特異的な標的又

特表平7-501698 (5)

はエピトープに対する結合特性を維持するよう、イムノグロブリン超科遺伝子生成物の十分なる領域を含むべきである。

ロイシンジッパー

近年、「ロイシンジッパー」としてデザインされているタンパク質構造のモチーフが同定されている (Landschultzら(1988) *Science* 240 : 1759)。ロイシンジッパーは当業界で、互いに 6 個のアミノ酸により翻されている 4 ~ 5 個のロイシン残基を含む約 35 個のアミノ酸の鎖として定義されている (Maniatis と Abel(1989) *Nature* 341 : 24)。ロイシンジッパーは様々な真核系 DNA 一結合性タンパク質、例えば c-fos, c-jun, c-jun 遺伝子生成物 (Fos)、c-jun 遺伝子生成物及び c-myc 遺伝子生成物の中で見い出されている。これらのタンパク質において、ロイシンジッパーは二量化の界面を供し、ここでロイシンジッパーを含むタンパク質は安定なホモ二量体及び/又はヘテロ二量体を形成しうる。

2 種のプロトオーソンジーン、c-fos 及び c-jun によりエンコードされるタンパク質生成物の分子分析は、優先的なヘテロ二量体の形成の如きの現象を示した。これら両者のDNA 一結合性タンパク質はロイシンジッパー領域を含むが、しかしながら Jun はホモ二量体を形成することができ、そして Fos と Jun と互いにヘテロ二量化することができ、Fos のホモ二量化の证据はほとんど認められていない (Genta ら、(1989) *Science* 243 : 1695; Nakabeppu ら (1988) *Cell* 55 : 907; Cohen ら (1989) *Genes Dev.* 3 : 173)。従って、Fos ロイシンジッパーは Jun と優先的に二量化でき、その理由は Jun ロイシンジッパーと Fos ロイシンジッパーとの間のヘリックス界面での特徴的な相互作用にある (O'Shea ら、前掲; Schoenwa (1991) *Nucleic Acids Res.* 19 : 739)。

Fos 及び Jun のロイシンジッパー領域を含んで成る合成ペプチド

は単独でヘテロ二量体形成に十分であり、そして合成ペプチドのアミノ末端それが分子間ジスルフィド結合を可能とするようにシステイン残基を含むとき、ヘテロ二量体形成はホモ二量化の実質的な排除に対しても起こる。

本発明のロイシンジッパーは 7 残基反復 (ロイシン-X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆)。として知られる一般構造式を有し、ここで X_i は任意の常用の 20 アミノ酸 (Proteins, Structures and Molecular Principles, (1984) Creighton (著)、W.H. Freeman and Company, New York; 引用することで本明細書に組入れる) であつてよいが、最も好ましくは高いオーヘリックス形成能力を有するアミノ酸、例えばアラニン、バリン、アスパラギン酸、グルタミン酸及びリジンであり、(Richardson と Richardson, (1988) *Science* 240 : 1648)、そしてロ_i は 3 以上であつてよいが、しかしながら典型的には 4 又は 5 である。この 20 の常用のアミノ酸はグリシン、プロリン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、メチオニン、トリプトファン、フェニルアラニン、イソロイシン、ロイシン、バリン、アラニン、セリシン、スレオニン、システィン、グルタミン、アスパラギン、チロシン、アスパラギン酸及びグルタミン酸である。

本発明のロイシンジッパーは対合的親和性を有する。ロイシンジッパーは両親属性アルファヘリックス、そしてより詳しくは巻型コイルを形成する。対合的親和性とは、ある種のロイシンジッパー、例えば限定するわけではないが Fos ロイシンジッパーの、別の種のロイシンジッパー、例えば限定するわけではないが Jun ロイシンジッパーとのヘテロ二量体を優先的に形成する能力と定義し、従って二種のロイシンジッパーが十分なる濃度で存在しているとき、ヘテロ二量体の形成がホモ二量体の形成に優先する。従って、ヘテロ二量体の形成は、典型的には 50 ~ 75%、優先的には 75 ~ 85%、そして

最も好ましくは 85% 以上のヘテロ二量体である二量体集団をもたらす。「Fos ロイシンジッパー」は図 1 (b) に示す配列に実質的に類似するアミノ酸配列として定義する。「Jun ロイシンジッパー」は図 1 (b) に示す配列に実質的に類似するアミノ酸配列として定義する。当業者は、本発明のロイシンジッパーが、図 1 に示すものとは、例えば限定するわけではないが内部もしくは末端付加、欠失もしくは置換により、又は 7 残基反復の順序が入れ代わっていることにより同一でないアミノ酸配列を含んで成りうることを理解するであろう。例示のため、しかしながら限定するわけではなく、本発明はグリシン及び/又はシステインを含んで成る末端アミノ酸の附加又は置換を包括する。

Jun 及び Fos タンパク質のロイシンジッパー領域は通常、タンパク質を互いに結合せしめて転写因子、AD-1 を形成せしめるように働く。Jun 及び Fos ジッパーは、それらが遺伝子的に融合している他のタンパク質、例えば二価特異性抗体の 2 つの Fab' とも二量化するであろう。2 つのジッパーペプチドの対合的結合はホモ二量体よりもヘテロ二量体の形成の傾向により高いため、所望の生成物の形成は高まる。

二価特異性抗体

二価特異性抗体の異なる結合特異性を有する二つのエピトープ結合性成分を連結することにより形成されうる。

本発明の「エピトープ結合性成分」とは、イムノグロブリン超科遺伝子により実質的にエンコードされ、且つ抗原のエピトープに対して特異的な結合親和性を有する—又は複数のポリペプチドにより成るタンパク質を意味する。認められているイムノグロブリン遺伝子超科は *The Immunoglobulin Gene Super family*, A.P. Williams と A.M. Barclay、前掲に記載されている。イムノグロブリン遺伝子

の特定の例にはカッパー、ラムダ、アルファー、ガンマー、デルタ、エプシロン及びミュー定常領域遺伝子、並びに真大な数のイムノグロブリン可変領域遺伝子が含まれる。イムノグロブリンは抗体に加えて様々な形態において存在することができ、それには例えば Fv, Fab 及び Fab'、並びに一本鎖が含まれる (例えば, Huston ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 : 5879 - 5883 (1988) 及び Bird ら、Science, 242 : 423 - 426 (1988)、これらは引用することで本明細書に組入れる)。(一般的には、Hood ら、「Immunology」 Benjamin, N.Y. 第 2 版 (1989) 及びunkapiller と Hood, *Nature*, 323 : 15 - 16 (1986) を参照のこと: これらは引用することで本明細書に組入れる)。エピトープ結合性成分のその他の例には T-細胞抗原レセプター及び CD4 タンパク質が含まれ、これは MHC タンパク質上のエピトープに結合する。

「成熟」イムノグロブリンの天然の形態は、配列における 1 又は数個のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加により長さの点で若干変わることがよく知られている。従って、可変及び定常領域は共に実質的な天然改質に付されるが、しかしながら「実質的に同一」であり、且つその関連の活性を保持することが可能であり続いている。ヒト定常領域及び並び挿入可変領域 DNA 配列は様々なヒト細胞、しかし好ましくは不死化 B-細胞より、公知の手順に従って単離できる。類似の方法が非ヒト起源から非ヒトイムノグロブリン配列を単離するのに利用できる。発現及び分泌のための DNA 配列及び宿主細胞は数多くの起源、例えばアメリカン タイプ カルチャー コレクションより入手できる (「Catalogue of Cell Lines and Hybridomas」第 5 版 (1985) Rockville, Maryland, U.S.A.; これは引用することで本明細書に組入れる)。

イムノグロブリン鎖のこれらの天然形態に加えて、「実質的に同

特表平7-501698 (6)

一」である改質重複及び組合せが、当事者によく知られている様々なる組換DNA技術を利用することで簡単にデザイン及び製造できる。例えば、複は天然の配列より、数個のアミノ酸の置換、末端及び中間付加、及び欠失等によって一次構造レベルにおいて改変されうる。他方、一部の一次構造のみを含んで成るポリペプチドフラグメントを製造することができ、このフラグメントは又は複数のイムノグロブリン活性（例えば結合活性）を保有しうる。特に、数多くの遺伝子と同様に、イムノグロブリン関連遺伝子は、それぞれが又は複数の異なる生物活性を有している独立の機能性領域を含むことが知られる。一般に、所望のエピトープ結合性成分をエンコードする遺伝子の改質は様々な公知技術、例えば部位特異的突然変異誘発（Gillman and Smith, *Gene* 8 : 81-97(1979) 及び Roberts, S. ら *Nature* 328 : 731 - 734(1987) を参照のこと；共に引用することで本明細書に組入れる）によって容易に成し遂げることができる。本発明の好適な態様において、エピトープ結合性成分は「キメラ」又は「ヒト化」であるイムノグロブリン遺伝子によりエンコードされる（一般的には、Co and Queen(1991) *Nature*, 351 : 501 を参照のこと；これは引用することで本明細書に組入れる）。

適当なエピトープ結合性成分は当事者により、当事界に公知のDNA配列又はモノクローナル抗体源から作ることができ、これはより詳しくは引用することで本明細書に組入れるWO 90 / 07861 及び米国出願07/310,252 号に記載されている。

Fab' - Jun (*Jun* ロイシンジッパーを含む *Fab'*) 及び *Fab' - Fos* (*Fos* ロイシンジッパーを含む *Fab'*) タンパク質は、インビオで、一細胞系における同時発現により、又は別々の細胞における発現液にインビトロで混合することにより、二価特異性抗体を作るのに利用できうる。このインビトロ混合手順は二価特異性抗体の大容量

生産にとって好適である。*Fab'* に加えて、インビトロ混合により、その他のエピトープ結合成分を *Jun* 又は *Fos* ロイシンジッパーに連結させ、そして組合せることができうる。

インビトロ混合手順は、特定の *Fab' - Pos* 又は *Fab' - Jun* を一回のみ作り上げればよい利点を有しており、なぜならそれらは相補性ロイシンジッパーを含む様々なエピトープ結合性成分と組合せることができるものである。例えば、二価特異性抗体のT細胞結合性成分、即ち、*Fos* ロイシンジッパーと、T細胞抗原CD3に対する結合特異性部位を含んで成る *Fab'* は一回だけ作り上げればよく、なぜならこれらは *Jun* ロイシンジッパーを含む様々なエピトープ結合性成分のいづれか、例えば所望の標的細胞に対する結合親和性を有する *Fab' - Jun* 分子と組合せることができるからである。更に、*Fab* フラグメントは大腸菌 (*Escherichia coli*) の内で高レベルで生産され、従って *F(ab' - ジッパー)*、二価特異性抗体は大量に経済的に生産される可能性もあり、臨床試験を可能にする。

エピトープ結合性成分に連結したロイシンジッパーは様々な方法で製造できうる。例えば、限定するわけではないが、ロイシンジッパーを含んで成る融合タンパク質をエンコードするポリヌクレオチド配列は細胞宿主により又はインビトロ翻訳系において発現されうる。他方、ロイシンジッパー及び/又はエピトープ結合性成分は化学ペプチド合成により、所望のポリペプチドをエンコードするポリヌクレオチド配列の発現により、又はロイシンジッパー、抗体もしくは巨大分子物質を含むその他のタンパク質の切断及びその後の精製のいづれかにより、個別に製造できうる。かかる精製ポリペプチドは介在スペーサーアミノ酸配列を伴ってもしくは伴わないペプチド結合により、又は介在スペーサー分子を伴ってもしくは伴わないペプチド共有結合により連結することができ、ここで、この

後者のスペーサー分子はアミノ酸であるか、又はその他の非アミノ酸化学構造体のいづれかである。連結の方法又はタイプに関係なく、かかる連結は可逆性でありうる。例えば、限定するわけではなく、かかる可逆性連結は化学的に不安定な結合、ペプチジル又は他のものを含んで成ることができ、これは自発的に、又は熱、電磁線、プロテアーゼもしくは化学試薬による処理によって切断されうる。かかる可逆性連結の二つの例を例示のために挙げるが、それらに限定するわけではない。それらは：(1) ヒドロキシルアミンにより切断されうるAsn - Gly ペプチドを含んで成る連結、及び(2) 選元剤により切断されうるジスルフィド結合連結である。

一般に、以降に、及び下記の記載の組換DNA技術における研究室手順に用いられている命名は公知のものであり、当事界に一般的に利用されている。標準技術をクローニング、DNA及びRNA単離、増幅及び精製のために用いた。DNAリガーゼ、DNAポリメラーゼ、制限エンドヌクレアーゼ等を包括する一般的な酵素反応は製造者の仕様に従って行った。これらの技術及びその他の技術は一般にSaebrook ら *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989に従って行った。この論文にわたって他の一般的な文献が紹介されている。その中の手順は当事界に公知であると信じられ、そして読み手の便宜のために紹介する。その中に含まれている全ての情報は引用することで本明細書に組入れる。

所望の二価特異性抗体を発現可能な本発明の核酸配列は様々な技法により様々な異なるポリヌクレオチド（ゲノム又はcDNA、RNA等）より形成されうる。適当なゲノム配列の連結が現在最も一般的な製造方法であるが、しかしcDNA及び合成配列も利用できうる（欧洲特許出願85102655.8, 85305604.2; 84302368.0及び85115311.4号、

並びにPCT出願GB85/00392 及びUS86/02269号を参照のこと；全て引用することで本明細書に組入れる）。

DNA構築体は典型的には、天然に一体化している又は外来のプロモーター領域を含む、コード配列に作動連結している発現コントロールDNA配列を含むであろう。好ましくは、この発現コントロール配列は、真核宿主細胞を形質転換又はトランسفェクトせしめるとの可能なベクター中の真核プロモーター系であろう。ベクターを適当な宿主の中に組込んだら、その宿主をヌクレオチド配列の高レベル発現にとて適切な条件のもとで維持し、そして二価特異性抗体を回収及び精製する。

上述した通り、このDNA配列は、その配列を発現コントロール配列に作動連結せしめた後（即ち、構造遺伝子の翻訳を確実にする位置）、宿主の中で発現されるであろう。これらの発現ベクターは典型的にはエピソームとして、又は宿主の染色体DNAの組込部として宿主生物の中に複製可能となる。一般に、発現ベクターは選択マーカー、例えばテトラサイクリン又はネオマイシンを、所望のDNAで形質転換されたこれらの細胞の検出を可能とするために含むであろう（引用することで本明細書に組入れる米国特許第4,704,362号を参照のこと）。

一般に、二価特異性抗体の成分をエンコードするDNA配列のクローニングのために原核細胞が利用できる。大腸菌が本発明のDNAの配列のクローニングにとって特に有用な原核宿主の一つである。利用できうる特定の大腸菌株にはRB101、DH-1及びNH-1が含まれる。

利用にとって適当なその他の微生物宿主には、バチルス属、例えばバチルス・スブチルス (*Bacillus subtilis*)、及びその他の腸内細菌、例えばサルモネラ (*Salmonella*)、セラチア (*Serratia*) 及

特表平7-501698 (ア)

び様々なシードモナス (*Pseudomonas*) 種が含まれる。これらの原核宿主においても、典型的には宿主細胞に適応する発現コントロール配列 (例えば複製起点) を含むであろう発現ベクターを作り出すことができる。更に、任意の数のよく知られている様々なプロモーター、例えばラクトースプロモーター系、トリプトファン (*trp*) プロモーター系、ベーターラクタマーゼプロモーター系又はファージラムダに由来するプロモーター系が存在してよい。このプロモーターは典型的には、任意的にオペレーター配列で発現をコントロールし、そして転写及び翻訳を開始及び終了させるためのリボソーム結合部位配列等を有する。

その他の微生物、例えば酵母も発現のために利用できる。サッカロマイシス (*Saccharomyces*) は好適な宿主であり、所望の発現コントロール配列、複製起点、停止配列等を有する適当ベクターを有している。典型的なプロモーターには 3'-ホスホグリセラートキナーゼ及びその他の解糖酵素が含まれる。誘発性酵母プロモーターにはとりわけ、アルコールデヒドロゲナーゼ 2、イソチトローム C、並びにマルトース及びガラクトース利用にとって重要な酵素に由来するプロモーターが含まれる。

酵母の中で利用するためのベクターを構築するとき、プラスミド *YEp3T* が利用できる (Stinchcombe, *Nature*, 282 : 39 (1979) を参照のこと)。このプラスミドは、トリプトファンを含む培地での増殖能力を欠く突然変異株にとっての選択マークーである *trp* 1 遺伝子を含む。*trp* 1 遺伝子の存在は形質転換突然変異細胞が選択培地の中で増殖し、同定されることを可能とする。

微生物に加えて、哺乳動物組織細胞培養物も本発明のポリペプチドの製造に利用できる (Winnacker, "From Genes to Clones" VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987) を参照のこと; 引用することで

本明細書に組入れる)。真核系細胞が実際には好ましく、その理由は当業界においてインクルトタイムノグロブリンを分泌可能な数多くの適当な宿主細胞系が開発されているからであり、そしてそれには CHO 細胞系、種々の COS 細胞系、Bela 細胞、ミエロース細胞系等が含まれるが、しかし形質転換された B 細胞又はハイブリドーマが好みしい。これらの細胞にとっての発現ベクターは発現コントロール配列、例えば複製起点、プロモーター、エンハンサー (Queen, C. and Lemon, Rev., 82 : 49-68 (1986); 本明細書に引用することで組入れる)、並びに必須のプロセシング情報部位、例えばリボソーム結合部位、RNA スプライス部位、ポリアデニル化部位及び転写ターミネーター配列を含みうる。好適な発現コントロール配列はイムノグロブリン遺伝子、サイトメガロウィルス、SV40、アデノウイルス、牛パピロマウイルス等である。

真核系 DNA 転換はベクターの中にエンハンサー配列を挿入することによって高めることができる。エンハンサーはプロモーターによる転写を高める 10~300bp のシス作用配列である。エンハンサーは転写単位に対して 5' 又は 3' のときに転写を有効に高めうる。それらはインストロン内に、又はそれ自体のコード配列内にあると最も有効である。典型的には、ウィルス性エンハンサー、例えば SV40 エンハンサー、サイトメガロウィルスエンハンサー及びアデノウイルスエンハンサーが利用される。哺乳動物系に由来するエンハンサー配列、例えばマウスイムノグロブリン遺伝子エンハンサーも一般に利用されている。

哺乳動物発現ベクター系は一般に選択マークー遺伝子も含むであろう。適切なマークーの例には、ジヒドロホレートリダクターゼ遺伝子 (DHFR)、チミジンキナーゼ遺伝子 (TK) 又は耐薬剤性を担う原核系遺伝子が含まれる。最初の二つのマークー遺伝子は増殖培地

へのチミジンの添加抜きで増殖能力を欠く突然変異細胞系の利用に優先される。形質転換細胞は從って非付加培地でのその増殖能力により同定できうる。マークーとして有用な原核系耐薬剤遺伝子には G418、ミコフェノール酸及びヒグロマイシンに対する耐性を担う遺伝子が含まれる。

対象の DNA セグメントを含むベクターは細胞宿主のタイプに依存して公知の方法により宿主細胞の中に移入できる。例えば、塩化カルシウムトランスフェクションが原核細胞に関して一般に利用され、一方、リン酸カルシウム処理もしくはエレクロポレーションが他の細胞宿主に関して利用されている。哺乳動物細胞を形質転換せしめるのに用いられるその他の方法にはポリブレンの利用、プロトプラスト融合、リボソーム及びマイクロインジェクションが含まれる (一般的には、Sambrook ら前掲を参照のこと)。

発現させたら、二価特異性抗体、エビトープ結合性部位、その二量体、又は連結ロイシンジッパーを有するもしくは有さない個々の軽鎖及び重鎖、又は個々のロイシンジッパー物質それ自体を、当業界の標準の手順、例えば硫酸アンモニウム沈殿、分画カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等によって精製してよい (一般的には、Scopes, R. の *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y. (1982) を参照のこと)。所詮の通りに部分的に又は均質に精製したら、そのポリペプチドはこれにより治療に、又は免疫蛍光染色等のアッセイ手順を開発及び実施するうえで利用できうる (一般的には、*Immunological Methods*, 第 I 及び第 II 卷、Laffovits and Pernis 著、Academic Press, New York, N.Y. (1979 及び 1981) を参照のこと)。

本発明の二価特異性抗体は治療に利用できうる。例示であつて限定ではないが、それらの癌、自己免疫疾患又はウィルス感染症に利用できうる。癌の処置のため、エビトープ結合性成分の一つを典型

的には細胞膜上に優先的に発現される抗原、例えば erbB-2、CEA、CD33 及びその他の数多くの当業界に公知の抗原に結合させてよい。自己免疫疾患の処置のためには、エビトープ結合性成分の一つを典型的には T 細胞上で発現される抗原、例えば CD4、IL-2 レセプター、様々な T-細胞抗原レセプター、及び当業界に公知の数多くのその他の抗原に結合させてよい (例えば *Fundamental Immunology*, 第 2 版、H.E. Paul 著、Raven Press : New York, NY を参照のこと; 引用することで本明細書に組入れる)。ウィルス感染症の処置のためには、エビトープ結合性成分の一つを典型的には特定のウィルスにより感染された細胞上で発現される抗原、例えばヘルペス单纯ウイルス及びサイトメガロウイルスの種々の糖タンパク質 (例えば gB, gD, gH)、並びに当業界に公知のその他の数多くの抗原に結合させてよい (例えば *Virology* 第 2 版、B.N. Pfeiffer 著 (1990), Raven Press : New York, NY を参照のこと; 引用することで本明細書に組入れる)。全てのケースにおいて、第二エビトープ結合性成分は一般に、T 細胞又はその他の活性化性シグナルを伝達可能な白血球上で発現されるエビトープ、例えば CD3 又は CD16 に結合するであろう。

本発明の二価特異性抗体を含んで成る薬理組成物は非経口投与、即ち皮下、筋肉内又は静脈内投与にとって有用である。非経口投与用組成物は一般に許容されている抗体、好ましくは水性抗体中に溶解している抗体の溶液又はそのカクテルを含んで成るであろう。様々な水性抗体、例えば水、緩衝水、0.4% の食塩水、0.3% のグリシン等が利用できる。これらの溶液は滅菌であり、そして一般に粒状物質を含まない。これらの組成物は常用の公知の滅菌技術によつて滅菌されうる。この組成物は、生理条件に近づけるために必要な薬理学的に許容されている補助物質、例えば pH 調整剤及び緩衝剤、毒性調整剤等、例えば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリ

特表平7-501698 (8)

ウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウム等を含みうる。これらの配合物の中での二価特異性抗体の濃度は約0.01%以下、通常は少なくとも約0.1%の低さから、5重量%ほどの多くにまで変えてよく、そしてそれは主に液体容量、粘度等を基準として、選ばれた投与の特定の態様に応じて選択されるであろう。

尚、筋肉内注射にとって典型的な薬理組成物は1:1の滅菌生理水及び約1mgの二価特異性抗体を含むように調製されうる。静脈内点滴のための典型的な組成物は250mlの滅菌リンガー溶液及び10mgの二価特異性抗体を含むように調製されうる。非経口投与用組成物の調製のための実際の方法は公知であるか又は当業者に明らかであり、そして例えれば引用することで本明細書に組入れる Remington's Pharmaceutical Science第15版、Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania(1980)に詳しく記載されている。

本発明の二価特異性抗体を貯蔵のために凍結乾燥し、そして使用前に適当な担体の中で再構成することができる。この技術は常用的の免疫グロブリンに有効であることが示されており、そして当業界公知の凍結乾燥及び再構成技術が利用できる。凍結乾燥及び再構成は様々な度合いの抗体活性損失を招くことがあることが当業者に理解されており（例えれば常用的の免疫グロブリン、IgM抗体はIgG抗体よりも大きく活性損失する傾向にある）、従って使用レベルは補足のために調整されうる。

本二価特異性抗体又はそのカクテルを含む組成物は予防及び/又は治療処置のために投与されうる。治療用途においては、組成物を、特定の障害に既に患う患者に、その症状及びその合併症を治療又は少なくともある程度緩和するのに十分な量で投与する。これを成し遂げるのに適切な量を「治療的有効用量」と定義する。この利用にとって有効な量は症状の重症度及び患者自身の免疫系の一般状態に

依存するであろうが、しかし投与当り約0.01～約100mgの二価特異性抗体の範囲が一般的であり、患者当り1～10mgの用量がより一般に利用される。

予防用途においては、この二価特異性抗体又はそのカクテルを含む組成物を、患者の耐性を高めるために疾患状態にない患者に投与する。かかる量は「予防的有効用量」と定義する。この用途においては、ここでもその正確な量は患者の健康状態及び免疫性の一般レベルに依存するが、しかし一般には投与当り0.1～100mg、特に患者当り1～10mgに範囲する。

該組成物の一回又は数回の投与は、処置医師により選ばれる用量レベル及びパターンによって実施されうる。全ての状況において、該薬理組成物は患者の有効な処置に十分なる量の本発明の二価特異性抗体を供すべきである。

本明細書に記載の二価特異性抗体は診断及びイメージング目的のために、エビトープ結合性成分と、検出試薬、例えはフェリチン (Hammerlingら(1968) *J. Exp. Med.* 128 : 1461) 又は西洋ワサビペルオキシダーゼ (MilsteinとCuello(1983) *Nature* 305 : 537) を架橋するのに利用することもできる。この検出試薬はエビトープ結合性成分に、この二価特異性抗体の第二エビトープ結合性成分を介して連結されうるか、又は本明細書に記載のロイシンジッパーを形成するヘテロ二量体によって第一エビトープ結合性成分に直接連結されうる。同様に、メタロチオネイン、即ち重金属原子に結合するタンパク質を、融合タンパク質としてFos ロイシンジッパーと共に、且つ Fab' - Jun に連結されて発現されうる。得られる生成物は放射性核種をイメージング及び治療に関する抗原抱合部位に連結するために利用できうる。同様に、例示であり限定でなく、タンパク質毒素、例えはリシン又はシードモナスエルギノーザ

(*Pseudomonas aeruginosa*) 外毒素も、Fos ロイシンジッパーに融合させ、次いで Fab' - Jun に連結せしめて、免疫毒素として利用されることもできる。

細胞活性に対する保護もしろくは検出、又は特定の細胞表面レセプターの存在における課題の二価特異性抗体を伴う利用のためのキットも供給してよい。従って、本発明の課題の組成物は通常は容器中の凍結乾燥形態において、単独で、又は所望の細胞タイプに特異的な別の抗体と一緒に供給されうる。ラベルもしろくは毒素にコンジュゲートされている、又はコンジュゲートされていないこの二価特異性抗体はキットの中で、緩衝剤、例えはトリス、リン酸塩、炭酸塩等、安定剤、殺菌剤、不活性タンパク質、例えは血清アルブミン等、及び一連の使用のための仕様書と共に含まれている。一般にこれらの物質は活性抗体の量を基礎として約5重量%以下、そして通常は抗体濃度に基づいて少なくとも約0.001重量%の純重量において存在しているであろう。しばしば、この活性成分を希釈するために不活性増量剤又は賦形剤を含ませることが所望され、この場合、その賦形剤は組成物全体の約1～99重量%において存在しうる。アセトキノンにおいて二価特異性抗体に結合可能な第二抗体を利用するとき、これは別々のバイアルの中に通常入っているであろう。この第二抗体は典型的にはラベルにコンジュゲートされており、そして上記の抗体組成物と類似の方法で調合される。

下記の例は限定ではなく例示のために提供する。

実験

プラスミドの構造

Fos 及びJun のロイシンジッパー領域に関する遺伝子を別々に、4種の重複合成オリゴヌクレオチドを用いて合成した（モデル380B DNA合成装置、Applied Biosystems, Foster City, CA）。次に各遺

伝子を Yenと Fried (Yenと Fried(1989) *Natl. Acad. Sci.* 86 : 4849) により述べられているポリメラーゼ連鎖反応(PCR) 法 (Saitoら、(1988) *Science* 239 : 487) を用いてマウス IgG2a遺伝子（図1）の C₂エクソンの第一コドンに段階的に融合させた。得られる PCR 生成物は 911bp の Xba I - Sal I フラグメントであり、C₁I エクソンの一部、C₁I : H イントロン、ヒンジ (H) エクソン、H : C₂イントロン及び C₂/ジッパー-エクソンを含む。Xba I 部位は C₁I エクソン内の天然の創断部位であるが、Sal I 部位は PCR 中にジッパー配列の末端に付加されたものである。マウス IgG2a遺伝子の 3' 非コード配列を含む 162bp の Sal I - Bam HI フラグメントも PCR により作り上げた。この配列は C₁III エクソンの停止コドンのすぐ 3' で始まり、そしてポリアデニル化シグナルを供する。Jun 及び Fos 蛋白のための、Xba I - Sal I 及び Sal I - Bam HI フラグメントを次に共にマウス重複発現ベクターの Xba I と Bam HI 部位との間に挿入し、C₂ 及び C₂ III エクソンを C₂/ジッパー-オノンに交換した（図2）。選択マークとして突然変異ジヒドロホレートリダクター遺伝子 (dhfr) (Simonsen と Levinson(1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 : 2495)、ヒトサイトメガロウィルス (hCMV) 主要軽時初期プロモーター及び転写開始のためのエンハンサー (Boshartら (1985) *Cell* 41 : 521)、並びにマウス IgG2a重複領域を含む重複発現ベクターを、標準の方法によって対応のフラグメントから構築した。

マウス抗 Tac 重複遺伝子 (Queen(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 10029) を含む Xba I フラグメントを次に Junジッパー含有ベクターの Xba I 部位（図2）に挿入してプラスミド pTAC-Jun を作った。同様に、ハムスター抗体 145-2C11 重複遺伝子の V_H 遺伝子を Fos ジッパー含有ベクターの中に挿入してプラスミド p145-

特表平7-501698 (9)

2C11-Fos を作った。軽鎖発現のため、bCHVプロモーター及びエンハンサー、並びに先行イントロンの一部を含むネオ C_e遺伝子を含む二種類のベクターを用いた。これらのベクターのうちの一方はキサンチングアニンホスホリボシルトランスクレーヴィング(spt) 遺伝子を含み (Mulligan and Berg (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072)、そして他方はヒグロマイシンBホスホトランスクレーヴィング(hyg) 遺伝子を含む (Blochlinger and Diggelmann (1984) Mol. Cell. Biol. 4: 2929)。これらのベクターは標準の方法により対応のフラグメントから構築した。Xba I 部位を抗-Tac 及び 145-2C11 の V_L 遺伝子アフターフラグメントに、PCR によって付加した。抗-Tac の V_L 遺伝子を spt 含有ベクターの中に、そして 145-2C11 の V_L 遺伝子を hyg 含有ベクターの中にクローニングして、対応のプラスミド pTAC-K 及び p145.2C11-K を作り上げた。

トランスクレーブィング。 トランスクレーブィングは Gene Racer 装置 (Bio-Rad, Richmond, CA) を用いる、製造者の仕様書に従う 350V 及び 25 μA 容量でのエレクトロポレーションによる。トランスクレーブィングの前に、軽鎖及び重鎖含有プラスミドを PspL で線状にし、フェノールクロロホルムで抽出し、そしてエタノール沈殿させた。全てのトランスクレーブィングはリン酸緩衝食塩水 (PBS) の中に 20 μg の各プラスミド DNA 及び 10⁷ Sp2 / 0 細胞 (ATCC CRL 1581) を用いて行った。各トランスクレーブィング由來の細胞を一枚の 96穴組織培養プレートの中でプレートした。48hr 後、選択培地を適用した： DMEM + 10% の仔牛血清 (FCS) + 下記のいづれか： RT 培地補充剤 (Sigma, St. Louis, MO) と 300 μg / ml のキサンチンと 1 μg / ml ミコフェノール酸 又は 500 μg / ml のヒグロマイシン (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN)。ウェルが生存細胞コロニーで密な後、各ウェル由來の培地をヤギ抗マウスガンマ-Ig (Sigma)

を用いる ELISA により分泌抗体の存在及び量についてアッセイした。

フローサイトメトリー。 2.5 × 10⁴ の HuT-102 細胞を 100 μl の PBS 中の様々な濃度の抗-Tac、抗-Tac-Jun 又は二価特異性 F (ab')-ジッパー₂ と 4 °C で 30 分インキュベートした。次に細胞を PBS 中で洗い、50 ng 的 FITC コンjugate 化ラット抗マウスサッバー (Pandex, Mundelein, IL) を含む 25 μl の PBS 中に再懸濁し、そして 4 °C で 30 分インキュベートした。細胞を PBS で洗い、1 % のバラホールムアルデヒドで固定し、そして PACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA) により分析した。抗-CD3 又はその誘導体の EL4 細胞への結合を同様に分析した。二価特異性 F (ab')-ジッパー₂ の濃度を評価するため、蛍光強度、対、抗-CD3 抗体濃度の標準曲線を利用した。

F (ab')-ジッパー₂ の精製。 トランスクレクト体の培地上清液をモノクローナルラット抗マウスサッバーセファロースカラム (Zymed, South San Francisco, CA) に通し、そして結合タンパク質を 0.2M のグリシン-ECL, pH 2.1 で溶出させた。溶出した部分をトリスペースで中和し、そして PBS に対して透析した。一の実験において、粗トランスクレクト体由来の濃縮培地を 10 mM の HES 緩衝液の中に 1 : 4 に希釈することによって pH 5.2 に合わせ、次いで FPLC 系 (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, NJ) 上での分離のために BAKERBOUND ABx カラム (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) に載せた。結合タンパク質を 0 ~ 0.25 M の (NH4)₂SO₄ の線形勾配で溶出させ、そして F (ab')-ジッパー₂ タンパク質を ELISA 又は上記のフローサイトメトリーにより同定した。インビドロで形成された二価特異性 F (ab')-ジッパー₂ も同様に ABx カラムクロマトグラフィーにより精製した。不純百分中の F (ab')-ジッパー₂ 濃度を上記のフローサイトメトリーにより評価した。純粋なタンパク質は

分におけるその濃度を 280nm の吸収によって、1 mg / ml が 1.4 の A₂₈₀ を有すると仮定して決定した。

インビドロでの二価特異性 F (ab')-ジッパー₂ の形成

抗-Tac-Jun と抗-CD3-Fos のホモ二量体を PBS 中で 2-メルカプトエタニルアミンで 37 °C で 1 時間かけて還元して、Feb'-ジッパーを形成せしめた。それらを次に混合し、そしてレドックス緩衝液 (50 mM のトリス-ECL, pH 8.5, 1 mM の EDTA, 500 μM の還元グルタチオ及び 500 μM 酸化グルタチオン) に対して 4 °C で 48hr 透析し、そしてその緩衝液を透析により PBS に戻した。

マウスエフェクター細胞による細胞障害アッセイ。 DMEM + 10% の FCS + 4 μg / ml のコンカナバリン A の中にマウス脾臓細胞を培養した。3 日後、その細胞を DMEM + 10% の FCS + 10 U / ml の組換 IL-2 (Amgen, Thousand Oaks, CA) の中に 1 : 2 に継代培養した。エフェクター細胞を 4 日後に回収し、そして細胞障害アッセイにおいて用いた。標的細胞を、HuT-102 細胞を 100 μCi の Na³^{CrO₄} (Amersham, Chicago, IL) と、100 μl の DMEM の中に 37 °C で 1 h インキュベートすることによって調製した。その細胞を使用前に DMEM で 2 回洗った。細胞障害性を 96 穴組織培養プレートの中での標準 ³^{Cr}-放出アッセイによって測定した。各ウェルは 50 μl の PBS 中の二価特異性 F (ab')-ジッパー₂、50 μl の DMEM 中の 10⁴ の ³^{Cr}-ラベル化 HuT-102 細胞、及び DMEM 中の 50 μl のエフェクター細胞を受け入れた。各ウェル中の總容量は 200 μl とした。その細胞混合物を 37 °C で 4 h インキュベートして溶解させた。遠心後、上清液を各ウェルから取り出し、HuT-102 細胞からの ³^{Cr} の放出についてアッセイした。細胞障害アッセイにおける比活性のパーセンテージは：(二価特異性 F (ab')-ジッパー₂)₂ により放出された計測数、引く、F (ab')-ジッパー₂ を加えずに放出された計測数) /

(0.1 % の SDS により放出された計測数、引く、F (ab')-ジッパー₂)₂ を加えずに放出された計測数) × 100 として計算した。細胞障害アッセイにおける全ての点は三重測定で決定され、そしてその平均値をプロットした。

Pab'-ロイシンジッパー遺伝子の構築及びトランスクレーブィング

我々は、Jeo 又は Fos ロイシンジッパー配列をマウス IgG2a 遺伝子の C_e2 エクソンの第一コードン (図 1) に連結するために PCR 法を利用した。融合連結部において、2 個のグリシンコードンを導入して、その連結をタンパク質生成物においてより柔軟なものとなるようにした。ロイシンジッパー配列の後方に、停止コードン及びマウス IgG2a 遺伝子に由来するボリアデニル化シグナルを含む配列を含ませた。その遺伝子融合体を、重複合成のために事前に使用されている発現ベクターの中に個別に挿入した (図 2)。所望の抗体についての V_H 遺伝子を得られる新たなベクターの Xba I 部位の中に挿入できる。mRNA 脱毒物はこれにより各プラスミド上の CHV プロモーターから開始し、そして V_H、C_e1、ヒンジ及び C_e2 / ロイシンジッパー エクソンが互いに分断し合うであろうことが予測される。

Jeo 発現プラスミドの中に、我々はマウス抗-Tac 抗体の V_H 遺伝子を、そして Fos プラスミドの中に、ハムスター 145-2C11 抗体の V_H 遺伝子を挿入した。抗-Tac 抗体はヒト IL-2 レセプター (IL-2R) の p55 領域に結合する (Uchiyama ら (1981) J. Immunol. 126: 1393)；その重鎖及び軽鎖遺伝子は既にクローニングされている (Queen ら (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029)。145-2C11 抗体はマウス CD3 複合体の E 領域を認識する (Lee ら (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 1374)；その重鎖及び軽鎖もクローニングされている。各 V_H 遺伝子はシグナル配列及び J セグメントを含み、そして C_e1 ドメインへのスプライシングを可能とするス

特表平7-501698 (10)

プライドナー配列がそれに続いた (Queen ら (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 10029)。抗-Tac 及び 145-2C11 の V_c 遺伝子をマウス V_e 遺伝子と共にそれ自身と類似のプラスミドを調製した (図 2)。

各重鎖発現プラスミドを対応の軽鎖プラスミドと共にネズミエローマ細胞系 Sp2/0 に同時トランスフェクトした。安定なトランスフェクト体を抗-Tac-Jun について *esp*-マークー及び抗-CD3-Pos についての *hyg*-マークーを用いて選別した。各トランスフェクト体由来の培地上清液をヤギ抗マウスガンマ抗体による ELISA によって抗体タンパク質の存在についてスクリーンした。ELISA-陽性トランスフェクト体をフローサイトメトリーを利用して確認し、CD3 及び p55 陽性細胞系への抗体様分子結合の存在についてその上清液を試験した。両ケースにおいて、トランスフェクト体は 10³ のミエローマ細胞当たり約 1 の頻度で獲得された。そのトランスフェクト体は約 0.1 ~ 2 μg / ml / 10³ 細胞 / 24 h の F(ab')² 様分子を分泌した。これらの分子の生産レベル類似の実験の中での完全抗体分子のそれより若干低いことが認められた。抗-Tac-Jun 及び抗-CD3-Pos について高い生産性のトランスフェクト体を異なる特性決定のために増殖させた。

抗-Tac-Jun 及び抗-CD3-Pos の精製及び特性決定

抗-Tac-Jun 及び抗-CD3-Pos を精製するためにアフィニティークロマトグラフィーを利用した。各種のトランスフェクト由来の上清液をラット抗マウスカッパーセファロースカラムに載せた。カラムに結合したタンパク質をグリシン-HCl により pB2-1 で溶出させた。PBS に対する透析の後、溶出したタンパク質を還元又は還元せずに SDS PAGE ゲル (Laemmli (1970) *Nature* 227: 680) で分析した (図 3)。還元タンパク質は、軽鎖及び重鎖 Pd-ジ

ッパーのそれぞれに対応する 25Kd 及び 31Kd の見かけ分子量の 2 本のバンドのみを示した。非還元タンパク質は約 25Kd 以下及び 100Kd 以上の見かけ分子量の主要バンドを示した。両バンドが軽鎖及び Pd-ジッパーに還元されるという事実において、それらは遊離の軽鎖 (25Kd) 及び 抗-Tac-Jun と抗-CD3-Pos との P(ab'-ジッパー)、二量体を示すようである。更に、抗-CD3-Pos サンプルは、下記のように確認した通りに軽鎖二量体より成る 50Kd のバンドを含んでいた。タンパク質を精製するために用いたアフィニティークロマトグラフィーは遊離軽鎖及び軽鎖二量体を捕獲するが、遊離 Pd-ジッパー鎖を捕獲しないことが述べられうる。従って、この 50Kd のタンパク質は Pd-ジッパー二量体ではないと考えられる。SDS PAGE 上でのタンパク質の泳動に及ぼす鎖内ジスルフィド結合の影響は還元した又はしていない軽鎖の泳動度を比較することによって観察できる。

インビオでの二価特異性 F(ab'-ジッパー) の形成。

プラスミド構築体が適切な F(ab'-ジッパー)、ホモ二量体の発現を導くことを示したところで、我々は次に二価特異性 F(ab'-ジッパー) が、抗-Tac-Jun 及び抗-CD3-Pos にとって必要な 4 種全てのポリペプチド鎖により単一トランスフェクト体の中でインビオで産出されることを示した。抗-Tac-Jun トランスフェクト体に抗-Tac-Jun のためのプラスミド構築体で更にトランスフェクトして、*esp* 及び *hyg*-マークーの両者を用いて超トランスフェクト体を選別し、そして精製 IL-2R p55 に結合できる抗体タンパク質の分離について ELISA によりスクリーンした。これらの超トランスフェクト体由来の上清液を抗-Tac 及び抗-CD3 活性の存在についてフローサイトメトリーにより更に分析した。

抗-Tac 及び抗-CD3 活性の両者を産出する代表的な超トランス

フェクト体をその抗体生成物を更に特性決定するために増殖させた。この超トランスフェクト体由来の培地上清液を ABX カラムで、(HR), 50°勾配で溶出させながら PPLC クロマトグラフィーにより分析した (図 4A)。マウス重鎖及び軽鎖についての ELISA アッセイにおいて反応性なタンパク質を含むピーク 5 つのみが溶出した (図 4B)。西分 I、II、III、IV 及び V として示す抗体陽性ピークを CD3・EL4 T-リンパ細胞及び IL-2R⁺ HuT-102 細胞に対する結合性についてフローサイトメトリーによりアッセイした。西分 II は抗-Tac 及び抗-CD3 活性の四分を含み、一方、西分 I はほとんどの抗-Tac 活性を含み、そして西分 III と IV と V は抗-CD3 活性のみを含んでいた (図 4C)。別の実験において、抗-Tac-Jun 及び抗-CD3-Pos をそれぞれ発現するトランスフェクト体由来の培地を同系でクロマトグラフィーにかけた：抗-Tac-Jun は西分 I と同じ位置において、そして抗-CD3-Pos は西分 IV の位置で溶出した (データーは示さず)。従って、西分 II は二価特異性抗体を含み、そして西分 III 及び V は抗-CD3 活性のみを有する他のハイブリド抗体を含んでいた。

西分 II が実際に二価特異性活性を含むかどうかを実証するために、我々は活性化マウス脾臍 T 細胞による ⁵¹Cr-ラベル化 HuT-102 細胞の溶解を仲介するためにそれを用いた (図 5)。西分 II 中のタンパク質は標的細胞を 20ng/ml 以下の濃度まで溶解せしめる。精製抗-CD3-Pos 及び抗-Tac-Jun ホモ二量体は単独で、又は組合させて、細胞を溶解するうえで競合的に有効でなかった。これらのデーターは、二価特異性抗体がインビオで事实上形成されていることを示唆する。

インビオでの二価特異性 F(ab'-ジッパー) の形成。 ホモ二量体 P(ab'-ジッパー)、タンパク質はヒンジ領域で還元されて

Fab' - ヒッパーモノマーを形成しうる。様々な濃度の 2-メルカブトエチルアミンを、重鎖 Pd-ジッパーからの軽鎖の解離を伴うことなく、Fab' - ヒッパーを形成する最も良の条件を決定するためには、還元生成物を非還元条件のもとで SDS PAGE で分析した。精製抗-Tac-Jun の還元のための最も良の条件は PBS の中の 4mM の 2-メルカブトエチルアミンにより 37°C で 1 h である。抗-CD3-Pos は同一の条件のもとで 2mM の 2-メルカブトエチルアミンを必要とした。これらの条件のもとで還元したこれらのタンパク質を図 6 に示す。両ケースにおいて、Fab' - ヒッパーに相当する 50 ~ 55Kd の一連のタンパク質バンドが還元により出現した。この不均一性の理由は不明であるが、しかしそれは他の者によって以前から観察されている (Curran と Franza (1988) *Cell*, 55: 395)。抗-CD3-Pos サンプル中の軽鎖二量体は非常にすばやくモノマーに還元もされうる。これらの条件のもとで、Fd-ヒッパー-バンドの非存在により証明される通り (図 3 で比較)、Fab' - ヒッパーからの軽鎖の解離は最少限であった。

抗-Tac 及び抗-CD3 Fab' - ヒッパー-タンパク質を 1 : 1 の比で混合して 100μg/ml の最終濃度にし、レドックス緩衝液に対して透析し、次いで PBS に対して透析した。Fab' - ヒッパーのバンドは消失し、そして F(ab'-ジッパー)、タンパク質に相当する新たなバンドが出現した (図 6、レーン 5)。この新たなタンパク質をインビオで産出させた F(ab'-ジッパー)、に関して用いたものと同じ条件のもとで ABX クロマトグラフィーにより分画した。3 つのメジャー及び 2 つのマイナータンパク質ピークがクロマトグラフィーにあった (図 7A)。ELISA、フローサイトメトリー (図 7B) 及び SDS PAGE (図 8) の組合せをピークの同定のために用いた。案通り (PT) 西分は過剰の軽鎖及び軽鎖二量体のみを含んでいた。

ATG CTC AGG GAA CAG GTG GCA CAG CTT AAA CAG AAA GTC ATG AAC T
 143 Met Leu Arg Glu Gln Val Ala Glu 35 Leu Lys Gln Lys Val Met Asn
 30 35 40
 GAGTCGGAC
 151

(2) SEQ ID NO: 3についての情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 42アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (D) トポロジー: 線状
- (ii) 分子の型: タンパク質

(xi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 3 :

Ala Gly Gly Arg Ile Ala Arg Leu Gln Glu Val Lys Thr Leu Lys
 1 5 10 15
 Ala Gln Asn Ser Gln Leu Ala Ser Thr Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln
 20 25 30
 Val Ala Gln Leu Lys Gln Lys Val Met Asn
 35 40

(2) SEQ ID NO: 4についての情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 151 基塩基
- (B) 型: 核酸
- (C) 構造: 一本鎖
- (D) トポロジー: 線状

(ii) 分子の型: DNA (ゲノム)

(ix) 特徴:

- (A) 名称/キー: イントロン
- (B) 位置: 1..16

1 CCATGTCTCCCATCA [CCA] GGC GGG CCC ATC GCC CGG CTC GAG GAA
 H:C₂H₂ C7D7 1-Ala Gly Gly Arg Ile Ala Arg Leu Gln Glu
 47 AAA GTG AAA ACC TTG AAA CCT CAG AAC TCG GAG CTC GCG TCG
 11-Lys Val Lys Thr Leu Lys Ala Gln Asn Ser Gln Leu Ala Ser
 89 AGC GCC AAC ATG CTC AGG GAA CAG STG GCA CAG CIT AAA CAG
 25-Thr Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln Val Ala Gln Leu Lys Gln
 131 AAA GTC ATG AAC TCA GTGGAC
 39-Lys Val Met Asn 停止

FIG. 1a.

1 CCATGTCTCCCATCA [CCA] GGC GGG TTA ACT GAT ACA CTC GAA GCG
 H:C₂H₂ C7D7 1-Ala Gly Gly Leu Thr Asp Thr Leu Gln Ala
 47 GAG ACC GAG GAG CTG GAA GAT AAG AAG TCT GCT CTC GAG ACC
 11-Ser Thr Asp Gln Leu Glu Asp Lys Lys Ser Ala Leu Gln Thr
 89 GAG ATT GCG AAC CTG CTG AAG GAG AAA CTC GAC TGC
 25-Glu Ile Ala Asn Leu Leu Lys Glu Lys Glu Lys Leu Glu Phe
 131 ATC CTG CCC GCC TGA GTGGAC
 39-Ile Leu Ala Ala 停止

FIG. 1b.

(A) 名称/キー: CDS

(B) 位置: 17..143

(xi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 4 :

CCATGTCTCCCATCA GCA GGC GGG TTA ACT GAT ACA CTC CAA GCG GAG
 49
 1-Ala Gly Gly Leu Thr Asp Thr Leu Gln Ala Glu
 5 10
 ACC GAC CAG CTG GAA GAT AAG AAG TCT GCT CTC GAG ACC GAG ATT GCC
 97
 15-Thr Asp Gln Leu Glu Asp Lys Lys Ser Ala Leu Gln Thr Gln Ile Ala
 20 25
 AAC CTG CTG AAG GAG AAG GAA AAA CTG GAG TTC ATC CTC GCC GCC T
 143
 30-Asn Leu Leu Lys Glu Lys Gln Lys Leu Glu Phe Ile Leu Ala Ala
 35 40
 GAGTCGGAC
 151

(2) SEQ ID NO: 5についての情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 42アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (D) トポロジー: 線状

(xi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 5 :

Ala Gly Gly Leu Thr Asp Thr Leu Gln Ala Glu Thr Asp Gln Leu Glu
 1 5 10 15
 Asp Lys Lys Ser Ala Leu Gln Thr Gln Ile Ala Asn Leu Leu Lys Glu
 20 25 30
 Lys Glu Lys Leu Gln Phe Ile Leu Ala Ala
 35 40

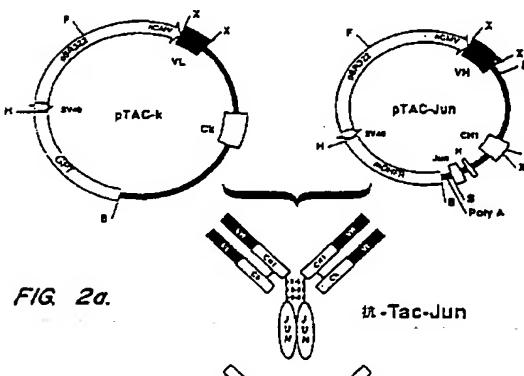


FIG. 2a.

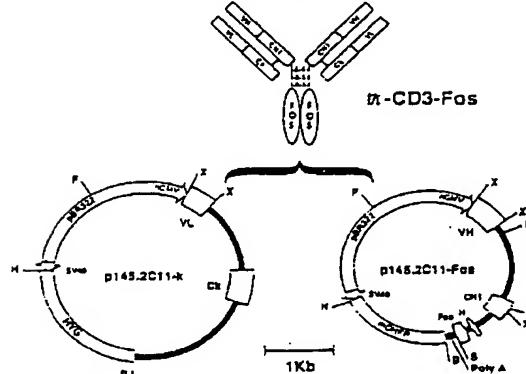


FIG. 2b.

BEST AVAILABLE COPY

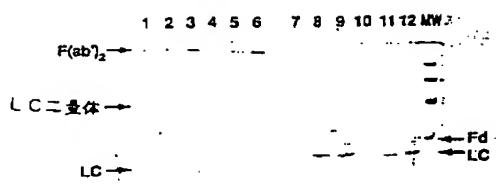


FIG. 3.

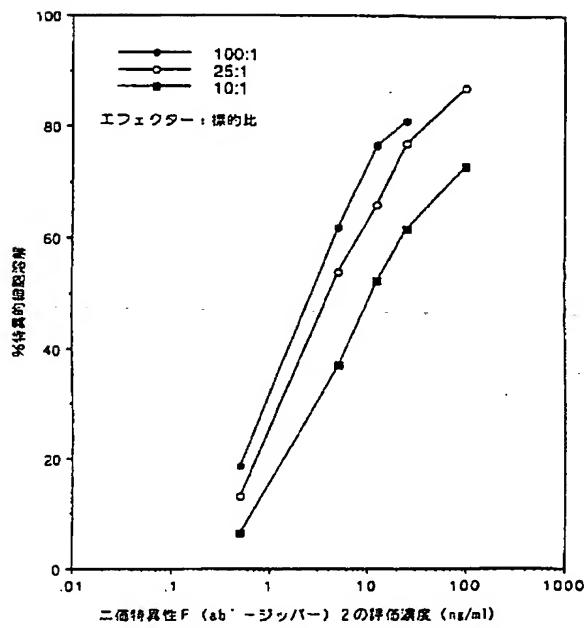
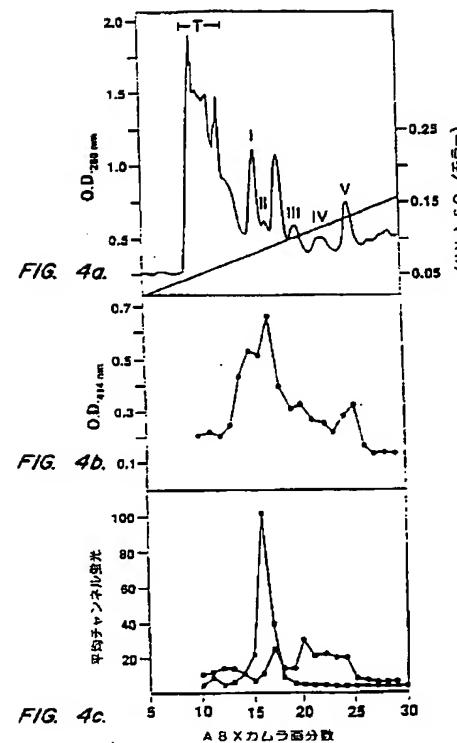


FIGURE 5

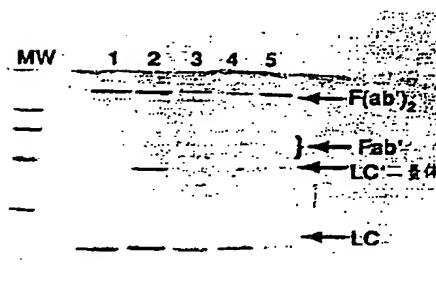


FIG. 6.

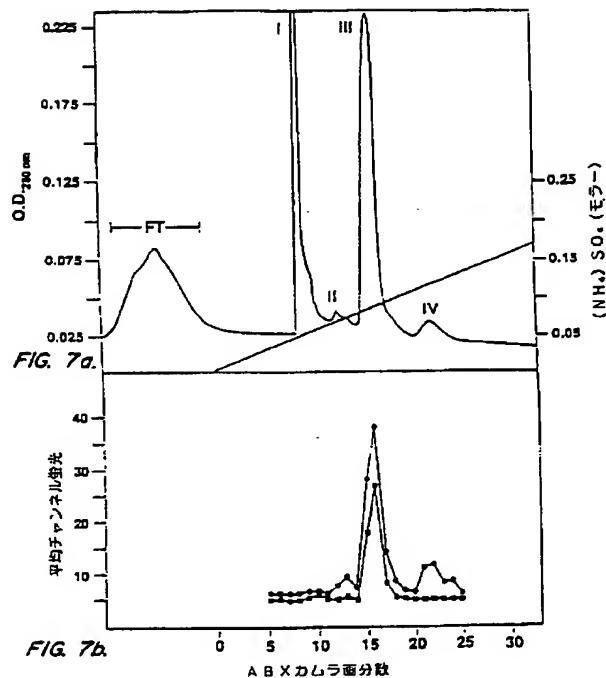


FIG. 7a.

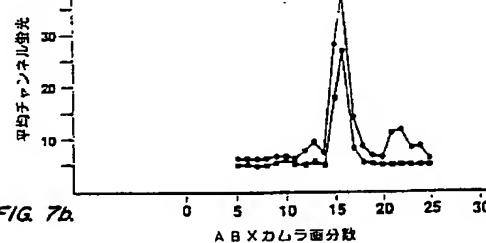
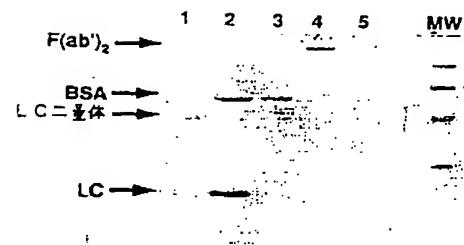


FIG. 7b.



BEST AVAILABLE COPY

FIG. 8a.

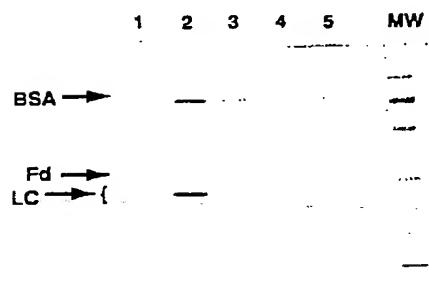


FIG. 8b.

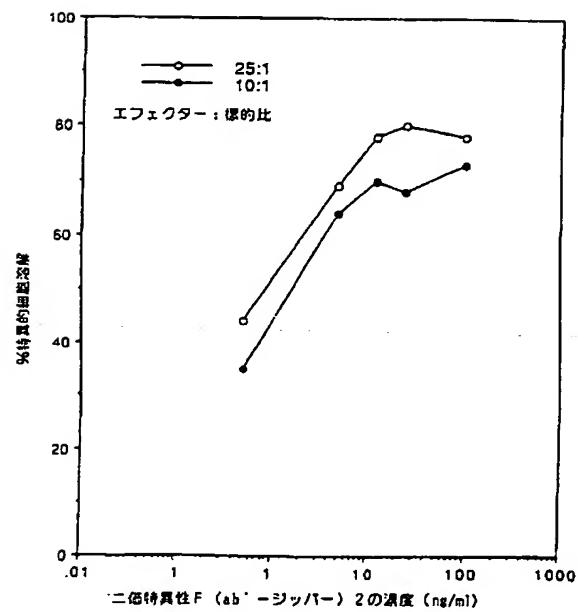


FIGURE 9

国際調査報告		International application No. PCT/US93/10140
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (IPC): C07K 1/52; C12P 11/06; C07H 15/00; A61M 31/04 U.S. CL.: 536/273, 397.1; 434/46; 536/27; 51/644 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Maximum documentation searched (Kanji/Pinyin system followed by classification symbol) U.S.: 338/373, 397.1; 434/46; 536/27; 51/644		
Documentation included other than maximum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS, CAS, MEDLINE, DIALOG		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Classification of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Journal of Immunology, Volume 139, Number 7, issued 01 October 1987, Glavis et al., "Preparation and performance of monoclonal Fab' antibody containing bacteriophage Fab' phage fragments", pages 2267-2272, see entire article.	1-23
Y	Science, Volume 242, issued 11 August 1989, O'Toole et al., "Prosthetic heterodimer frameworks by actuated inverse capture from Fox and Jun", pages 648-651, see entire article.	1-23
Y	Product Engineering, Volume 2, No. 4, issued 1991, Elford et al., "Engineering the quaternary structures of an enzyme protein with a flexible zipper", pages 437-441, see entire article.	1-23
Y	Proceedings of the National Academy of Sciences, Volume 83, issued October 1986, Gilbert et al., "Universal monoclonal antibody for targeting tumor cells for destruction by cytotoxic T cells", pages 7719-7723, see entire article.	1-23
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<small>* Special categories of cited documents: "A" means that the publication of the art which is not concerned in the field of patentability. "B" means that the document published or filed after the international filing date which may become relevant as priority claimed or which is quoted therein (or specified). "C" means referring to an end substance, use, relation or other document published later than the priority date concerned. "D" means published prior to the international filing date but later than the priority date concerned. </small>		
Date of the visual inspection of the international search	Date of mailing of the international search report 26 FEB 1993	
18 February 1993		
Name and mailing address of the I.A./ Commission of Patents and Trademarks U.S.P.T.O. Washington, D.C. 20530	Authorized officer LILA FEISZ Telephone No. (703) 328-0136	
Form PCT/ISA/210 (second sheet/July 1992)		

BEST AVAILABLE COPY

フロントページの続き

(51) Int.Cl. * 識別記号 庁内整理番号
 // A 6 1 K 39/395 A 9284-4C F I
 (C 1 2 P 21/08
 C 1 2 R 1:91)

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
 DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M
 C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG
 , CI, CM, GA, GN, ML, MR, SN, TD,
 TG), AT, AU, BB, BG, BR, CA, CH,
 CS, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, K
 P, KR, LK, LU, MG, MN, MW, NL, NO
 , PL, RO, RU, SD, SE

(72) 発明者 コステルニー, シエリ エー.
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 94041,
 マウンテン ビュー, チキータ アベニュー
 310

(72) 発明者 コール,マイケル エス,
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 94306,
 パロアルト, カレッジ アベニュー 990